

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 44 35 727 A 1

51 Int. Cl. 6:
G 01 N 33/553
G 01 N 33/68

21 Aktenzeichen: P 44 35 727.3
22 Anmeldetag: 6. 10. 94
43 Offenlegungstag: 11. 4. 96

Fipel

71 Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

72 Erfinder:
Batz, Hans-Georg, Dipl.-Chem. Dr., 82327 Tutzing,
DE; Sluka, Peter, Dipl.-Chem. Dr., 82362 Weilheim,
DE; Mutter, Wolfgang, Dipl.-Bio-Chem. Dr., 82347
Bernried, DE

54 Bindematrix und Analyseelement zur Simultananalyse verschiedener Analyte

57 Gegenstand der Erfindung ist eine Bindematrix, enthaltend ein flächenförmiges Trägermaterial, das parallel in horizontaler Richtung zu seiner Oberfläche mit einer Vielzahl von räumlich getrennten Bereichen bedeckt ist, die Bindepartner immobilisiert enthalten, die jeweils fähig sind, einen entsprechenden freien Bindungspartner eines spezifischen Bindungspaares zu binden, dadurch gekennzeichnet, daß die Bereiche gebildet werden aus

- a) sich nicht berührenden Metallschichtspots,
- b) über Ankergruppen jeweils an die Metallspots gebundene verdünnte und im wesentlichen lateral homogene Bindeschichten eines Bindepartners B1.

Die Bindematrix kann mit einer Vielzahl gleicher oder unterschiedlicher Bindungspartner belegt werden und dient damit als Analytelement zur gleichzeitigen Bestimmung unterschiedlicher Analyte in einer Probe oder zur Bestimmung gleicher Analyte in verschiedenen Proben.

DE 44 35 727 A 1

DE 44 35 727 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Bindematrix aus einem flächenförmigen Trägermaterial, das von einer Vielzahl horizontal räumlich getrennter Bereiche bedeckt ist, die mit unterschiedlichen spezifischen Bindungspartnern für freie Reaktanden belegt werden können, ein entsprechendes Analyseelement, ein Verfahren zu dessen Herstellung sowie die Verwendung des Analyseelementes zum gleichzeitigen Nachweis verschiedener freier Reaktanden oder Analyte oder zum gleichzeitigen Nachweis eines Analyten in verschiedenen Proben.

Um verschiedene Analyte aufgrund spezifischer Bindungsreaktionen räumlich nebeneinander nachzuweisen, zum Beispiel in Form eines Immunoassays, ist die gebräuchlichste Methode, die Vertiefungen von Mikrotiterplatten mit verschiedenen Antikörpern adsorptiv oder über eine Fixierungsschicht, wie zum Beispiel RSA/Streptavidin, zu beladen und in jeder Vertiefung einen Analyt zu bestimmen. Die vergleichsweise großen Abmessungen von Mikrotiterplatten erfordern große Mengen an Reagenz und Proben. Aufgrund der unebenen Geometrie der Wells können nur bestimmte Detektionsmethoden wie UV/VIS-Absorption oder Messung der Fluoreszenz in Lösung als Maß für die Bindung von Analyt an die Festphase angewandt werden.

Eine Verbesserung multipler Analytnachweise auf einem gemeinsamen Analysenträger wurde durch eine Miniaturisierung der Analyseelemente durch Adsorption von Antikörpern oder Antigenspots auf Nitrocellulose erreicht (Walch et al., J. Immunol. Meth. (1984), 66, 99—102; Derer et al., J. Allergy Clin. Immunol. (1984), 74, 85—92). Diese Analyseelemente werden insbesondere zur Allergiediagnostik verwendet. Wie bei Mikrotiterplatten ist der Nachteil auch hier, daß sich durch die adsorptive Beladung der Oberfläche mit immunologisch aktiven Reagenzien keine geordnete und definierte Belegung der Oberfläche einstellt, was sich ungünstig auf die Reproduzierbarkeit von Meßergebnissen auswirkt. Die starke Abhängigkeit des Variationskoeffizienten der Meßergebnisse von der Beschaffenheit der Oberfläche bei adsorptiver Beladung ist unter anderem im US-Patent 49 80 299 beschrieben. Während bei großen Oberflächen die statistischen Schwankungen der Oberflächenbelegung bei adsorptiver Beladung weniger ins Gewicht fallen, können sie sich bei zunehmender Miniaturisierung der Oberflächen auf die Reproduzierbarkeit sehr negativ auswirken, da hier insbesondere Mikroinhomogenitäten stärker ins Gewicht fallen. Quantitative Bestimmungen sind somit nur schwer möglich.

Multiple Reagenzträger zur parallelen Synthese verschiedener Polypeptid- oder Polynukleotidstränge sind in WO 92/10092, WO 91/07087 und EP 01 38 855 beschrieben. In WO 92/10092 wird ein homogenes Trägermaterial durch Einführung von Aminogruppen einheitlich über die gesamte Oberfläche funktionalisiert. An diese funktionalisierte Oberfläche wird großflächig ein Reaktand mit einer photochemisch abspaltbaren Gruppe gebunden. Durch Anlegen einer Maske kann an bestimmten Stellen selektiv die photochemisch abspaltbare Gruppe entfernt werden und selektiv eine Aminosäure oder eine Nukleotidbase chemisch gekuppelt werden. Durch Verwendung anderer Masken kann das gleiche Verfahren an anderen Stellen mit anderen Aminosäuren oder Nukleotidbasen fortgesetzt werden. Man erhält so auf der Trägersoberfläche nach vielen Arbeitsschritten beispielsweise eine Vielzahl unterschiedlicher Polynukleotidstränge, die zur Bindung und Bestimmung komplementärer Polynukleotidstränge dienen können. Nachteil bei diesem Verfahren ist, daß es sehr aufwendig ist, eine solche Mikrostrukturierung mit verschiedenen Analytbindungspartnern zu erzeugen. Die Belegung mit Bindungspartnern an belichteten Stellen ist sehr ungleichmäßig und wenig reproduzierbar.

In EP-A-01 34 215, EP-A-03 04 202 und EP-A-02 71 974 werden miniaturisierte Analyseelemente beschrieben, in denen Antikörperspots mit konventionellen Beschichtungstechniken auf beispielsweise Polystyroloberflächen durch Adsorption aufgebracht sind. Auch hier treten die durch starke Heterogenitäten der Oberflächen bedingten Schwankungen der Oberflächenbelegungen auf und bewirken eine schlechte Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse. Ein weiteres Problem sind unspezifische Bindungen von Proteinen aus Serum oder Plasma an die Oberfläche, was sich insbesondere bei kleinen Konzentrationen der Analyten und der Festphasenbindedepartner sowohl für die Bindung der Festphasenbindedepartner als auch für die Bindung des Analyten an den Festphasenbindedepartner nachteilig auswirkt.

Aufgabe der Erfindung war es daher, die oben beschriebenen Nachteile des Standes der Technik zu beseitigen und eine Bindematrix zur Verfügung zu stellen, auf die auf sehr kleiner Fläche eine Vielzahl von Festphasenbindungspartnern für verschiedene Analyte einfach reproduzierbar in einer gezielt einstellbaren Oberflächenbelegung und gleichzeitig örtlich begrenzt getrennt voneinander aufgebracht werden können, mit der nach Aufbringen der verschiedenen Festphasenbindungspartner eine Vielzahl von freien Analyten aus einer Lösung auf sehr engem Raum gebunden und detektiert werden können und mit dem die multiple Analytbestimmung somit in reproduzierbarer Weise unter gleichzeitiger Verminderung unspezifischer Bindungen von Probenbestandteilen sowohl qualitativ als auch insbesondere quantitativ durchgeführt werden kann.

Die Aufgabe wird gelöst durch eine Bindematrix und ein Analyseelement wie es in den Ansprüchen charakterisiert ist.

Gegenstand der Erfindung ist eine Bindematrix enthaltend ein flächenförmiges Trägermaterial, das parallel zu seiner Oberfläche mit einer Vielzahl von horizontal räumlich getrennten Bereichen bedeckt ist, die Bindepartner immobilisiert enthalten, die jeweils fähig sind, einen entsprechenden Bindungspartner eines spezifischen Bindungspaares zu binden, dadurch gekennzeichnet, daß die Bereiche gebildet werden aus

- a) sich nicht berührenden Metallschichtspots,
- b) über Ankergruppen jeweils an die Oberfläche der Metallspots gebundene verdünnte und im wesentlichen lateral homogene Bindebeschichten eines Bindepartners B1.

Unter einer flächenförmigen Bindematrix wird eine im wesentlichen ebene, bevorzugt eine planare Matrix verstanden. Obwohl sie prinzipiell eine beliebig große Oberfläche besitzen kann, kommen die Vorteile der Erfindung gegenüber dem Stand der Technik insbesondere bei kleinen Oberflächen zum Tragen. Vorteilhaft sind

daher Analyselemente mit einer Oberfläche von unter 100 cm^2 , bevorzugt zwischen 1 cm^2 und 25 cm^2 .

Auf der Trägermaterialoberfläche der Bindematrix sind nebeneinander in horizontaler Richtung eine Vielzahl von sich nicht berührenden Metallschichtbereichen ("Metallspots") aufgebracht.

Diese Bereiche bilden jeweils bevorzugt eine $10-100 \text{ nm}$ dicke Schicht auf dem Trägermaterial und können beliebige Flächen einnehmen, also kreisförmig oder eckig sein. Die Vorteile der Erfindung kommen besonders dann zum Tragen, wenn diese Bereiche sehr klein sind mit einem Durchmesser zwischen $0,1$ und 1 mm , ganz besonders bevorzugt zwischen $0,3$ und $0,6 \text{ mm}$.

Die Metallschichtbereiche sollen sich nicht berühren, das heißt die freien, von dem Trägermaterial abgewandten Oberflächen der Metallspots sollen von Zwischenflächen umgeben sein, deren Oberflächen aus einem von den Metallspots verschiedenen Material besteht. Im bevorzugten Fall werden die Zwischenoberflächen zwischen den Metallspots von einem nichtmetallischen Trägermaterial selbst gebildet. Günstig sind dabei Trägermaterialien, die nur eine sehr geringe unspezifische Wechselwirkung mit biologischen Molekülen, z. B. Immunreagenzien, haben. Günstig ist ein Abstand der äußeren Begrenzungen der Metallspots von $0,1-1 \text{ mm}$, um das spätere getrennte Auftragen von Reagenzien zu erleichtern.

Da die Spots erfindungsgemäß sehr kleine Flächen besitzen können, können auf einer sehr kleinen Trägermaterialoberfläche sehr viele Spots untergebracht werden.

Vorteilhaft sind $10-100$ Spots pro cm^2 Oberfläche des Trägermaterials, besonders vorteilhaft $20-50$.

Als Trägermaterial kann beispielsweise Polystyrol, Polycarbonat, Polyethylenacrylat, Polyethylen, Polypropylen oder Glas dienen.

Als Metalle werden bevorzugt Edelmetalle, insbesondere Gold, Silber oder Palladium verwendet.

An den Metallspots ist eine "verdünnte" Bindschicht eines auf allen Metallspots einheitlichen Bindepartners B1 oder auf verschiedenen Metallspots unterschiedlicher Bindepartner B1', B1'' usw. gebunden. Auf jedem Spot soll dabei aber nur eine Art eines Bindepartners in einer verdünnten Bindschicht gebunden sein. Solche verdünnte Bindschichten sind in der WO 92/10757 beschrieben, auf die hier vollinhaltlich Bezug genommen wird.

Unter einer "verdünnten" Bindschicht wird eine Monoschicht eines von dem Trägermaterial in den Raum wegweisenden spezifischen Bindepartners einer Molekülsorte verstanden, wobei die Oberfläche des Metallspots nicht vollständig belegt ist. Der Belegungsgrad mit dem Bindepartner, der ein Maß für die Verdünnung ist, kann ausgedrückt werden als Quotient aus gebundener Dicke der Bindschicht dividiert durch die theoretische Schichtdicke bei dichter Packung.

Der Belegungsgrad der Metallspots mit einer Monoschicht des Bindepartners B1 ist kleiner als 100% , vorzugsweise $0,1-90\%$, bevorzugt $0,7-70\%$, besonders bevorzugt $1-40\%$.

Die Adsorption der Bindschicht des Bindepartners wird über Ankergruppen vermittelt. Als Ankergruppen sind Thiol-, Disulphid-, oder Phosphingruppen geeignet. So sind zum Beispiel Thiol- oder Disulphidgruppen als Ankergruppen für Gold- oder Silberoberflächen und Phosphingruppen für eine Palladiumoberfläche besonders geeignet.

Vorzugsweise ist die Ankergruppe für die Adsorption an die Festphase nicht direkt am Bindepartner angebracht, sondern ist über ein Spacermolekül, vorzugsweise über ein flexibles Spacermolekül, verknüpft. Besonders bevorzugt enthält das Spacermolekül mindestens eine Alkylengruppe der Formel $(\text{CH}_2)_n$, worin n eine natürliche Zahl von $1-30$, vorzugsweise $2-30$, besonders bevorzugt $2-15$ darstellt. Auf seiner einen Seite enthält das Spacermolekül die Ankergruppe (zum Beispiel die Thiol- oder Disulphidgruppe), die zur Adsorption an die Oberfläche der Metallspots geeignet ist. Auf seiner anderen Seite, das heißt vom Trägermaterial weg, enthält das Spacermolekül eine oder mehrere Verknüpfungsgruppierungen, über die der Bindepartner oder eine Komponente davon mit dem Spacermolekül verknüpft ist. Bei diesen Verknüpfungsgruppierungen kann es sich zum Beispiel um eine Amino- oder Hydroxylfunktion handeln, die zum Beispiel mit einer Carboxylfunktion des Bindepartners unter Bildung einer Ester- oder Amidgruppe verknüpft ist. Das Spacermolekül kann jedoch auch als Verknüpfungsgruppe eine Carboxylfunktion enthalten, die dann wiederum mit einer reaktiven Amino- oder Hydroxylfunktion des Bindepartners verknüpft ist.

Die Herstellung von verdünnten Bindschichten ist in WO 92/10757 beschrieben.

Eine erste Möglichkeit besteht darin, ein Spacermolekül zu verwenden, das mit zwei oder mehreren Molekülen, vorzugsweise zwei Molekülen des Bindepartners verknüpft ist. Ein Beispiel für ein solches Spacermolekül ist Cystamin, das als Ankergruppe eine Disulphidgruppe und als Verknüpfungsgruppierung zwei Aminofunktionen enthält und daher mit zwei Molekülen eines aktivierten Bindepartners verknüpft werden kann. Solche Moleküle bilden bei Adsorption an eine Goldoberfläche eine verdünnte Bindschicht mit einem Belegungsgrad wesentlich kleiner als 100% bezogen auf den Bindepartner.

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung einer verdünnten Bindschicht ist der Einbau einer hydrophilen Linkergruppe zwischen dem Spacermolekül und dem Bindepartner. Dieser Linker ist insbesondere ein geradkettiges Molekül mit einer Kettenlänge von $4-15$ Atomen. Bevorzugt ist dabei eine Linkergruppe, die eine oder mehrere hydrophile Ethylenoxideinheiten, vorzugsweise zwischen 1 und 5 enthält. Besonders bevorzugt wird die hydrophile Linkergruppe durch ein Amin- oder Hydroxyl-terminiertes Polyethylenoxid gebildet.

Zwischen dem hydrophilen Linker und dem Bindepartner kann vorzugsweise ein weiteres Spacermolekül eingebaut werden, welches aus einer Alkylengruppe der Formel $(\text{CH}_2)_n$ und einer Verknüpfungsgruppierung besteht, worin n eine natürliche Zahl von $2-15$ ist. Als besonders geeigneter Linker hat sich 1,8-Diamino-3,6-Dioxaoctan erwiesen. Solche Verbindungen bilden bei Adsorption an eine Goldoberfläche eine Monoschicht mit einer Belegungsdichte von beispielsweise 19% bei Biotin als Bindepartner aus, die in der Lage ist, einen freien Reaktionspartner (Streptavidin) mit hoher Affinität und innerhalb kürzester Zeit zu einem dichtgepackten Film zu binden. Solche verdünnten Bindschichten sind daher besonders bevorzugt.

Ganz besonders bevorzugt sind die "verdünnten" Bindschichten, die zusätzlich zu den über Ankergruppen

und Spacern gebundenen Bindepartner auch noch Spacermoleküle enthalten, die zwar mit einer Ankergruppe verbunden sind, aber an die kein Bindepartner gebunden ist. Derartige Verbindungen werden im weiteren auch als Verdünnungsmoleküle bezeichnet. Wenn man zum Beispiel biotinylierte und nicht-biotinylierte Spacermoleküle im Verhältnis von 1 : 10 bis 1 : 2 einsetzt, so erhält man eine verdünnte Biotinmonoschicht, die einen freien Bindungspartner mit hoher Geschwindigkeit und großer Kapazität binden kann.

Geeignete Verdünnungsmoleküle enthalten eine Ankergruppe und einen Spacerbestandteil sowie gegebenenfalls ein Linkermolekül, wobei sich die Anzahl der CH_2 -Gruppen des Spacermoleküls um nicht mehr als 1—5, bevorzugt nicht mehr als 1—2 C-Atome von der Anzahl der CH_2 -Gruppen des Spacermoleküls unterscheidet, das an den Bindungspartner gebunden ist. Es hat sich weiterhin als zweckmäßig erweisen, daß die Mindestkettenlänge des Verdünnungsmoleküls 6 Atome (ohne Ankergruppe und hydrophile Linkergruppe) beträgt.

Anstelle des Bindepartners befindet sich vorzugsweise an der von der Ankergruppe entfernten Ende des Verdünnungsmoleküls eine hydrophile Funktion, wie zum Beispiele eine Hydroxylgruppe, eine Carbonsäuregruppe, eine Carbonsäureethylester- oder Methylestergruppe, eine Carbonsäureamidgruppe, eine mit ein oder zwei Methyl- oder Ethylgruppen substituierte Carbonsäureamidgruppe, eine Sulfonsäuregruppe oder eine Sulfonamidgruppe. Ebenso ist es bevorzugt, an das von der Ankergruppe entfernte Ende des Verdünnungsmoleküls einen hydrophilen Linker (gemäß obiger Definition) oder einen Teil eines hydrophilen Linkers zu binden.

Es ist auch möglich, einen Spacer mit Bindepartner und einen Spacer ohne Bindepartner über eine kovalente Bindung zu verknüpfen. Bei Verwendung von Gold- oder Silberoberflächen erfolgt diese Verknüpfung vorzugsweise über eine Disulphidbrücke.

In solchen gemischten Bindebeschichten, die aus Verdünnungsmolekülen (Spacermolekülen ohne Bindepartner) und aus Spacermolekülen mit Bindepartner bestehen, beträgt der Anteil der Spacermoleküle mit Bindepartner zweckmäßig 0,1—90 mol-%, vorzugsweise 0,5—50 mol-% und besonders bevorzugt 1—40 mol-%.

Als Bindepartner kann jeder Partner eines spezifischen Bindepaares benutzt werden, zum Beispiel Antikörper, Antigene, Proteine, Lektine, Biotin, Streptavidin oder Polynukleotide. Bevorzugt ist auf allen Spots eine verdünnte Bindebeschicht aufgebracht, die von demselben Bindepartner B1 gebildet wird.

Dabei handelt es sich vorzugsweise um Biotin oder Biotin-Analoga Moleküle wie Desthiobiotin, Iminobiotin oder HABA (4-Hydroxy-phenyl-azobenzoessäure), die ebenfalls mit Streptavidin reagieren.

Im Falle von Antikörpern, Antigenen, Haptenen oder Polynukleotiden ist es auch möglich, daß verschiedene Bindepartner unterschiedliche verdünnte Bindebeschichten auf einzelnen Spots bilden. Dies ist bei Polynukleotiden besonders bevorzugt. Im Grenzfalle befindet sich auf jedem Metallspot eine verdünnte Bindebeschicht eines anderen Bindepartners. Eine solche Bindematrix kann schon zur Bindung und zum Nachweis verschiedener freier Bindungspartner der Matrixbindepartner verwendet werden. Zusätzlich ist es möglich, daß auf verschiedenen Spots Bindebeschichten des gleichen oder unterschiedlicher Bindepartner aufgebracht sind, die einen von Spot zu Spot unterschiedlichen Verdünnungsgrad aufweisen.

Der Belegungsgrad des Bindepartners B1 der ersten Bindebeschicht auf den Metallspots läßt sich durch eine Dickenmessung der Bindebeschicht bestimmen. Dabei nimmt die gemessene Schichtdicke mit dem Belegungsgrad der Bindebeschicht ab. So hat eine Bindebeschicht mit Biotin als Bindepartner eine Dicke von 0,7 nm, wobei diese Dicke geringer als die errechnete Länge von 3,7 nm des Moleküls ist.

Weiterhin ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Bindematrix, dadurch gekennzeichnet, daß

a) Metallschichtspots auf die Trägermaterialoberfläche in der Weise aufgebracht werden, daß sie sich nicht berühren

b) die freie Oberfläche der Metallschichtspots jeweils mit einer Reaktionslösung inkubiert wird, die Moleküle zur Erzeugung einer verdünnten Bindebeschicht enthält.

In einem ersten Schritt werden auf das Trägermaterial des Analyseelementes in horizontaler Richtung voneinander getrennte diskrete Metallspots in einer Schicht parallel zur Oberfläche des Trägermaterials aufgebracht. Bevorzugt werden diese Spots in einem regelmäßigen Muster aufgebracht. Um das gewünschte Muster von Metallspots auf der Trägermaterialoberfläche zu erhalten, wird bevorzugt eine Maske verwendet, in der das gewünschte Muster freigelassen ist und die auf das Trägermaterial aufgelegt wird. Über die Maske wird dann das Muster der Metallspots durch Aufdampfen oder Aufputtern aufgebracht. Gegebenenfalls kann die Trägermaterialoberfläche vorher mit einem Haftvermittler, zum Beispiel Chrom, versehen werden. Je nach späterem Verwendungszweck kann die Dicke der aufgetragenen Metallspots unterschiedlich sein. Soll das Analyseelement für Oberflächenplasmonresonanz verwendet werden, so ist eine Metallschichtdicke von 10—100 nm bevorzugt. Ansonsten kann die Dicke auch größer sein.

Neben dem Aufbringen von Metallspots über eine Maske ist es auch möglich, das Analyseelement ganzflächig mit einer Metallschicht zu überziehen und durch Wegätzen von Metall nachträglich ein gewünschtes Spotmuster zu erzeugen. Möglich ist auch, ein Spotmuster auf einer Metalloberfläche durch Überziehen des Metalls mit einem nichtmetallischen Überzug, z. B. Wachs, zu erzeugen, wobei der Überzug die Zwischenflächen zwischen den Spots darstellt.

In einem zweiten Schritt werden die einzelnen Metallspots mit einer verdünnten Bindebeschicht überzogen. Soll diese verdünnte Bindebeschicht auf allen Spots dieselbe sein, wird das Trägerelement vorteilhafterweise in eine Lösung eingetaucht, die die für die Erzeugung einer verdünnten ersten Bindebeschicht notwendigen Moleküle enthält. Dies kann zum einen bevorzugt eine Mischung aus Anker-Spacer-Molekülen mit und ohne Bindungspartner in einem den Verdünnungsgrad bestimmenden Verhältnis sein, zum anderen kann dies eine Lösung aus solchen Molekülen sein, die wie oben beschrieben ebenfalls verdünnte Bindebeschichten erzeugen.

Sollen die verdünnten Bindebeschichten auf verschiedenen Spots unterschiedliche Bindepartner enthalten, so

werden verschiedene Lösungen auf einzelne Spots aufgegeben, die jeweils einen anderen Bindungspartner in einer verdünnten Binde-schicht erzeugenden Form enthalten. Statt dessen oder zusätzlich können so auch unterschiedliche "Verdünnungsgrade" der Binde-schichten auf verschiedenen Spots erzeugt werden, indem z. B. ein unterschiedlicher Anteil an Verdünnungsmolekülen in den einzelnen Lösungen vorhanden ist, die auf verschiedene Spots aufgegeben werden. Die räumlich getrennte Aufgabe der Reagenzien für verdünnte Binde-schichten kann über gebräuchliche Methoden wie Pipettieren, Stempel- oder Drucktechniken, z. B. Ink-Jet, erfolgen. Gegebenenfalls wird überschüssige Lösung wieder entfernt.

Diese verdünnten lateralen Binde-schichten sind mikroskopisch homogen, wie zum Beispiel durch Surface Plasmon Microscopy nachweisbar (B. Rothenhäusler und W. Knoll, Surface Plasmon Microscopy, Nature, Vol. 332, Seite 615—617 (1988)). Bei einer Auflösung von 5 µm sind keine Dickenunterschiede meßbar.

Eine bevorzugte Ausführungsform ist eine Bindematrix, die auf jedem Spot eine verdünnte Binde-schicht des gleichen Bindepartners enthält. Jede dieser Binde-schichten kann dann ihrerseits zur Bindung gleicher oder unterschiedlicher Bindungspartner dienen.

Hat die verdünnte Binde-schicht auf allen Spots an ihrer Oberfläche den gleichen Bindungspartner, dient diese Bindematrix mit einer verdünnten Binde-schicht, die in Form von räumlich getrennten diskreten Bereichen auf dem Trägermaterial über Metallspots aufgebracht ist, nun zum reproduzierbaren und über den Verdünnungsgrad der jeweiligen Binde-schicht einstellbaren bzw. optimierbaren Aufbringen einer Vielzahl von gleichen oder unterschiedlichen Bindungspartnern für freie Analyten auf diese diskreten Bereiche und bildet somit die Grundlage für ein Multianalyt-Analyseelement, das die gleichzeitige, genaue qualitative aber auch quantitative Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe oder eines Analyten in verschiedenen Proben auf engem Raum erlaubt, wobei nur sehr geringe Reagenz-mengen benötigt werden und diese Bestimmungen wenig durch unspezifische Bindungen von Blut- oder Serumbestandteilen wie z. B. Fibrinogen gestört werden. Gegenüber konventionellen "Multiparameter"-Analyseelementen wie Mikrotiterplatten ist dabei eine wesentlich höhere Zahl von Analysebereichen möglich. Auf einer Fläche von 100 cm² sind bis zu 100 000 Spots möglich, wobei die Herstellung der Bindematrix trotzdem sehr einfach ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Analyseelement zur Bestimmung unterschiedlicher freier Reaktanden in einer Probe oder zur Bestimmung eines Reaktanden in verschiedenen Proben, enthaltend ein flächenförmiges Trägermaterial, das parallel zu seiner Oberfläche mit einer Vielzahl von räumlich getrennten Bereichen bedeckt ist, auf denen unterschiedliche oder gleiche spezifische Bindungspartner für freie Reaktanden immobilisiert sind, dadurch gekennzeichnet, daß es eine erfindungsgemäße Bindematrix enthält, an die eine an die Bindepartner B1 oder, bei Vorhandensein eines zusätzlichen Bindepartners B2, eine an B2 spezifisch gebundene weitere Binde-schicht enthält, die an ihrer Oberfläche Bindungspartner B3 für zur bestimmende freie Reaktanden oder Analyte enthält.

Neben der ersten verdünnten Binde-schicht auf jedem Metallspot enthält demnach das erfindungsgemäße Multi-Reaktanden-Analyseelement zusätzlich auf jedem Spot eine weitere Binde-schicht gleicher oder unterschiedlicher Bindungspartner B3 für freie Reaktanden. Dabei ist auf jedem Spot nur eine Sorte von Reaktandenbindungspartnern gebunden. Diese Reaktandenbindungspartner können über eine spezifische Bindungsstelle mit dem Bindungspartner B1 der ersten Binde-schicht gekoppelt sein. Diese spezifischen Bindestellen können zum Beispiel ein Epitop für einen Antikörper der ersten Binde-schicht sein oder auch ein an die Analytbindepartner gebundenes spezifisches Bindemolekül, wie z. B. Biotin, das mit dem Bindungspartner der ersten Binde-schicht, z. B. Streptavidin, spezifisch koppelt.

Als Reaktandenbindungspartner werden spezifische Bindungspartner für freie, sich in Lösung befindende Reaktanden verwendet. Dies können Antikörper, Antigene, Haptene oder Nukleinsäurestränge sein.

In einer Ausführungsform dient eine Bindematrix, auf deren Spots sich eine verdünnte Binde-schicht eines einheitlichen Bindepartners B1 befindet, direkt zur reproduzierbaren Aufgabe einer weiteren Schicht von Spot zu Spot gleicher oder verschiedener Reaktandenbindungspartner B3, die über eine spezifische Bindungsstelle an B1 binden.

In einer anderen Ausführungsform werden die verdünnten Binde-schichten der einzelnen Spots jeweils durch eine weitere monomolekulare Binde-schicht mit einem einheitlichen Bindepartner B2 belegt. Dabei hat der Bindepartner B2 eine spezifische Bindestelle für B1. Da diese Belegung erfindungsgemäß auch auf sehr kleiner Fläche sehr gut reproduzierbar ist, können überraschenderweise die Bindepartner B2 der einzelnen Spots wiederum sehr gut für die reproduzierbare Belegung einer einstellbaren Menge einer weiteren Binde-schicht mit von Spot zu Spot gleicher oder verschiedener Reaktandenbindungspartner B3 dienen, die dann eine spezifische Bindestelle für B2 haben.

Entscheidend für die erfindungsgemäßen Vorteile bei beiden Ausführungsformen ist, daß die Bindematrix auf den Metallspots eine verdünnte Binde-schicht enthalten.

Es hat sich dabei überraschenderweise herausgestellt, daß bei Anwesenheit einer verdünnten Binde-schicht auf jedem Spot der erfindungsgemäßen Bindematrix, jeder Spot separat mit einer reproduzierbaren und definierten Menge an Reaktandenbindungspartnern B3 belegt werden kann — sei es direkt oder über eine Bindepartner-zwischenschicht B2 —, ohne daß darüberhinaus unspezifische Bindungen von Probenbestandteilen diese Belegung stören. Diese reproduzierbare Belegung wird überraschenderweise auch bei sehr kleinen Abmessungen der Spots erreicht, was auf eine sehr geringe Mikroinhomogenität der Binde-schichten schließen läßt. Dadurch werden Analyseelemente mit einer Vielzahl von Spots mit einer konstanten und homogenen Bindepartner-Belegung jedes Spots auf sehr kleinem Raum ermöglicht. Zusätzlich läßt sich die Belegung der verschiedenen Spots mit Reaktandenbindungspartnern überraschenderweise auch über den Verdünnungsgrad der verschiedenen Binde-schichten einfach und reproduzierbar steuern, so daß jeder Binde-schicht nsport individuell bezüglich des nachzuweisenden Reaktanden und bezüglich erforderlicher Sensitivität zum Nachweis dieses Reaktanden eingestellt werden kann.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Analyseelementes zur multiplen Bestimmung gleicher oder unterschiedlicher freier Reaktanden, dadurch gekennzeichnet, die freien Oberflächen der Bindschichten einer Bindematrix jeweils mit gleichen oder unterschiedlichen Lösungen inkubiert werden, die Bindepartner B3 für freie Reaktanden enthalten, wobei die Bindepartner B3 eine spezifische Bindestelle für die Bindepartner B1 oder B2 haben.

Das Aufbringen der verschiedenen Bindschichten mit gleichen oder verschiedenen Bindungspartnern für freie Reaktanden auf die Bindematrix kann auf verschiedene Weise erfolgen.

Im einfachsten Falle werden mit einer Pipette auf verschiedene Spots, die jeweils mit einer ersten verdünnten Bindschicht bedeckt sind und gegebenenfalls mit einer weiteren Bindschicht mit dem Bindepartner B2 bedeckt sind, gleiche oder verschiedene Bindungspartner B3 für freie Reaktanden als Lösung aufgebracht. Diese Bindungspartner B3 müssen alle eine gemeinsame Bindestelle für den einheitlichen Bindepartner B1 der ersten verdünnten Bindschicht oder gegebenenfalls den Bindungspartner B2 der zweiten Bindschicht aufweisen. Bevorzugt sind sie an ein einheitliches Bindemolekül für den Bindungspartner B1 oder B2 gebunden. Ein Beispiel für Bindungspartner B3 sind unterschiedliche Antikörper, die an Biotin gebunden sind. Auf unterschiedliche Spots, die mit einer verdünnten Biotinbindeschicht und einer daran gebundenen Streptavidinbindeschicht belegt sind, werden dann unterschiedliche biotinylierte Antikörper aufgebracht, wobei sich diese an die Streptavidinphase binden, da Streptavidin insgesamt 4 Bindungsstellen hat. Man erhält so ein Analyseelement, das auf engstem Raum Felder zur Bindung vieler unterschiedlicher freier Reaktanden besitzt. Diese Reaktandenbindungspartnerschichten bilden eine reproduzierbare Belegung der Bindschichten der Bindematrix.

Wird auf jedem Spot ein einheitlicher biotinylierter Antikörper des Bindungspartners für ein freies Antigen aufgebracht, können mit dem Analyseelement gleichzeitig eine Vielzahl von Proben gemessen werden, die dieses Antigen zu dem festphasengebundenen Antikörper enthalten.

Weitere Möglichkeiten zur Aufgabe verschiedener Bindungspartner auf die jeweiligen Spots stellen Drucktechniken oder Stempeltechniken, insbesondere Ink-Jet, oder die Aufgabe mittels einer Mikromultipin-Platte analog zur Aufgabe verschiedener Reagenzien bei Mikrotiterplatten, dar. Gegebenenfalls wird überschüssige Lösung wieder entfernt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung mindestens zweier Reaktanden oder Analyten in einer Probelösung mittels spezifischer Bindungsreaktionen der Analyten mit festphasengebundenen Analytbindungspartnern auf einem flächenförmigen Analyseelement, dadurch gekennzeichnet, daß man die Probelösung mit einem erfindungsgemäßen Analyseelement kontaktiert und die Anwesenheit oder Menge festphasengebundener Analyte in verschiedenen Bereichen des Analyseelementes getrennt bestimmt.

Analyt und festphasengebundener Reaktandenbindungspartner bilden dabei ein spezifisches Bindepaar. Analyte können sein: Antikörper, Antigene, Haptene, Nukleinsäuren, die zumindest teilweise komplementär zu einer festphasengebundenen Nukleinsäure sind, und andere spezifische Bindungspartner.

Der Nachweis der Bindung des Analyten an den Festphasenbindungspartner wird beispielsweise dadurch ermöglicht, daß der Analyt eine Markierungsgruppe trägt oder durch Bindung mit einem weiteren freien Bindungspartner eine Markierung erhält. Als Markierung kommen die bei Immunoassays oder in der DNA-Diagnostik üblichen Markierungen in Frage. Vorteilhaft ist insbesondere die Markierung mit einer Direktmarkierung, insbesondere mit einem fluoreszierenden oder lumineszierenden Bestandteil. Die dadurch ermöglichte optische Beobachtung der Bindung des Analyten an den Festphasenbindungspartner eines bestimmten Spots erlaubt einen genauen qualitativen oder quantitativen Nachweis dieses Analyten.

Um die Bindung der Analyte auf einzelnen Spots nebeneinander und insbesondere auch quantitativ nachweisen zu können, können bevorzugt ortsauflösende Detektionsmethoden verwendet werden. Eine bevorzugte Methode ist z. B. die konfocale scanning Fluoreszenzmikroskopie. Bei dieser Methode wird auf jedem Spot einzeln der zur Markierung verwendete Fluoreszenzfarbstoff mit Hilfe eines Lasers geeigneter Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt (scanning). Das emittierte Licht wird mittels empfindlicher Detektoren, wie z. B. integrierender CCD-Cameras aufgezeichnet, und mit geeigneter Bildauswertesoftware quantifiziert. Auch andere, nichtscannende fluoreszenzmikroskopische Methoden sind zur Auswertung gut geeignet. In diesem Fall werden mehrere Spots in einem Bildausschnitt gleichzeitig betrachtet. Die Auswertung der einzelnen Spots erfolgt dann z. B. hintereinander mit Hilfe geeigneter Bildauswertesoftware.

Eine weitere Meßmethode der Bindung eines Analyten an den Festphasenbindungspartner stellen optische, insbesondere reflektionsoptische Techniken dar, bei denen die Zunahme der Schichtdicke einer extrem dünnen Schicht mit dem trägerfixierten Bindungspartner durch Bindung des freien Analyten beobachtet werden kann. Ein Überblick über diese Techniken wird gegeben in Sadowsky: "Review of optical methods in immunosensing", SPIE, Vol. 1954, Optical Testing and Methodology II (1988), 413—419. Hier ist keine spezielle Markierung der Analyte nötig.

Ein besonders bevorzugtes reflektionsoptisches Verfahren ist der Nachweis der Bindung verschiedener Analyten in verschiedenen Bereichen des Analyseelementes durch Oberflächenplasmonenresonanz. Bei diesen Verfahren besteht das Analyseelement aus einem durchsichtigen, dielektrischen Material, auf dem in sehr geringer Schicht eine metallisch leitende Schicht in Spotform aufgebracht ist, welche den Festphasen-Bindungspartner trägt. Solche Analyseelemente werden vielfach auch als optische Immunsensoren bezeichnet. Beispiele für solche optischen Immunsensoren sind in der EP-A 01 12 721, EP-A-02 76 142 und in der EP-A-02 54 557 beschrieben.

Auch andere ortsauflösende Detektionsmethoden wie z. B. elektrochemische Messungen, Leitfähigkeitsänderungen oder Messung von radioaktiver Markierung sind möglich. Zur Analyse einer Probe auf bestimmte Analyte wird die Probe entweder großflächig auf das Analyseelement oder separat auf einzelnen Spots aufgebracht. Gegebenenfalls werden zusätzlich markierte Bindungspartner für die zu bestimmenden Analyte zugege-

ben. In diesem Fall wird das Analyseelement vor Messung der an die Festphase gebundenen markierten Analyte vorteilhafterweise von freien Markierungsmolekülen frei gewaschen.

Das Analyseelement kann auch zur Bestimmung eines oder mehrerer Analyten in verschiedenen Proben benutzt werden.

Gegenstand der Erfindung ist daher auch ein Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung eines Analyten in verschiedenen Proben mittels spezifischer Bindungsreaktionen des Analyten mit festphasengebundenen Analytbindungspartnern auf einem flächenförmigen Analyseelement, dadurch gekennzeichnet, daß man verschiedene Probenlösungen mit verschiedenen Bereichen eines erfindungsgemäßen Analyseelements kontaktiert, wobei in den Bereichen gleiche Analytbindungspartner gebunden sind und die Anwesenheit oder Menge des festphasengebundenen Analyt in verschiedenen Bereichen getrennt bestimmt.

Die verschiedenen Probenlösungen können dabei durch übliche Aufgabetechniken wie Pipettieren, Druck- und Stempeltechniken oder eine Mikromultipinplatte aufgegeben werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Bindematrixes bzw. Analyseelemente zum gleichzeitigen Nachweis einer Vielzahl von Analyten insbesondere in Immunoassays, beispielsweise für die Allergiediagnostik oder für die DNA Diagnostik, beispielsweise zum Screenen einer Probe auf Polynucleotide mit bestimmten Sequenzen.

Beispiel 1

1. Herstellung der Spots durch Aufdampfen

Auf "Lexan" Polycarbonatfolien (Hersteller: General Electric, Dicke 0,75 mm) mit den Abmessungen 8×8 cm wurden über eine Metallmaske ($d = 0,5$ mm, Material: Aluminium) in einer Leybold Hochvakuum-Beschichtungsanlage (Univex 450) 36×36 runde Goldspots (insgesamt 1296 Spots) in gleichmäßigen Abständen aufgedampft. Die Schichtdicke des aufgedampften Goldes beträgt 300 nm. Der Durchmesser der Spots beträgt 1 mm, der Abstand von Spot zu Spot ebenfalls 1 mm nach allen Seiten.

2. Beschichtung der Multi-Goldspotplatte mit "verdünnten" Biotinthiol-Bindeschichten

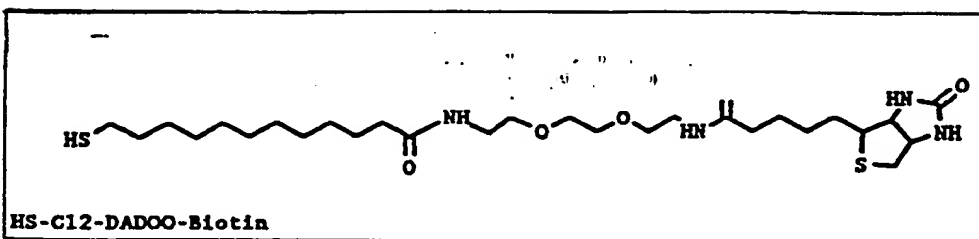
2.1 "Hydrophile" Schicht

2,8 mg (5×10^{-5} m) der Biotin-Thiolverbindung I und 8,7 mg ($4,5 \times 10^{-4}$ m) des Verdünnens II wurden in 100 ml 0,05 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,25 gelöst. In diese Lösung wurden die frisch beschichteten Polycarbonatfolien getaucht. Nach einer Stunde wurden die Platten entnommen, $2 \times$ mit Wasser (bidest.) gewaschen und an der Luft getrocknet.

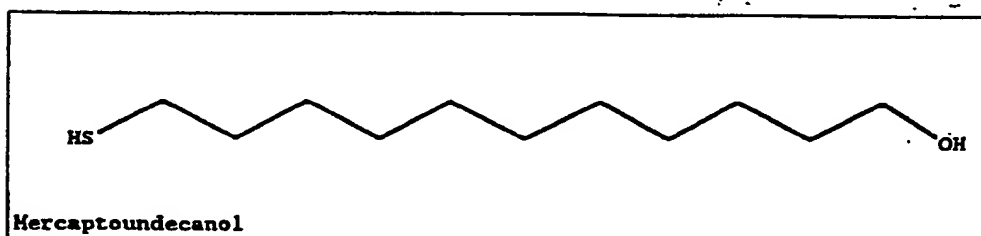
2.2 "Hydrophobe" Schicht

2,94 mg (5×10^{-5} m) der Biotin-Thiolverbindung III und 9,2 mg ($4,5 \times 10^{-4}$ m) des Verdünnens IV wurden in 100 ml Ethanol p.a. gelöst. In diese Lösung wurden die frisch beschichteten Polycarbonatfolien getaucht. Nach 4 Stunden wurden die Platten entnommen, $2 \times$ mit Ethanol p.a. gewaschen und an der Luft getrocknet.

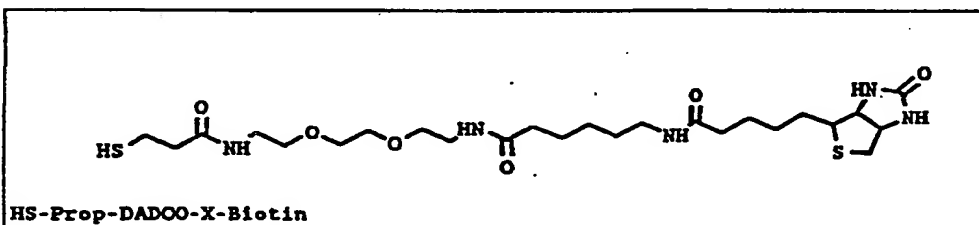
I.



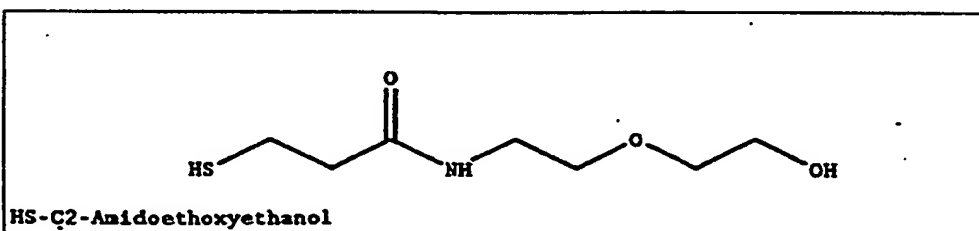
II.



III.



IV.



3. Aufbringen von Streptavidin

Die mit Goldspots und SAM beschichteten Folien wurden 1 Stunde in eine Streptavidinlösung getaucht (Konzentration Streptavidin: 0,5 mg/ml in 0,05 m K-Phosphatpuffer pH 7,2). Die Chips wurden danach mit einer Lösung aus 50 mM K-Phosphat-Puffer pH 7,2, 2% Saccharose, 0,9% NaCl und 0,3% RSA II gewaschen. Die Chips wurden anschließend bei 25°C und 40% Luftfeuchtigkeit 20 Stunden getrocknet.

4. Durchführung eines TSH-Tests

Auf den mit Streptavidin beschichteten Spots wurde ein TSH-Test nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Inkubation mit <TSH> MAK 1.20-Bi (1 : 4) für 45 Minuten, Konzentration des MAK 20 µg/ml, Puffer 20 mM K-Phosphat pH 7,4.
2. Waschen mit bidest. Wasser.
3. 45 Minuten Inkubation mit TSH Standard "Enzymun", Fa. B ehringer GmbH.
4. Waschen mit bidest. Wass r.
5. 30 Minuten Inkubation mit Fluoreszenz-Latex-Antikörper (A8)-Konjugat, 0,05% Feststoffanteil in 20 mM K-Phosphat Puffer pH 7,4.
6. Waschen mit bidest. Wasser.
7. Messung am konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Fa. Biorad).

Ergebnisse

Es wurden zwei Standards (10 μ U und 2 μ U) vermessen. Dabei wurden die folgenden relativen Intensitäten erhalten:

Standard	hydrophile verdünnte Bindschicht	hydrophobe verdünnte Bindschicht
0 μ U TSH	6,2	5,0
2 μ U TSH	29	140

Graphische Auswertung der Meßergebnisse (Anzahl von Pixeln gegen Fluoreszenzintensität) für die hydrophobe verdünnte Bindschicht siehe Fig. 1, 2.

Beispiel 2

Überprüfung der unspezifischen Bindung

Die mit Streptavidin beschichteten Spots der verdünnten hydrophoben Bindschicht aus Beispiel 1 wurden auf über Serumbestandteile vermittelte unspezifische Bindung des Fluoreszenzlatexkonjugats untersucht.

1. Waschen mit bidest. Wasser
2. 45 Minuten Inkubation mit Probe (Standards bzw. Serum)
3. Waschen mit bidest. Wasser
4. 30 Minuten Inkubation mit Fluoreszenz-Latex-Antikörper (A8)-Konjugat
5. Waschen mit bidest. Wasser
6. Messung am konfokalen Fluoreszenzmikroskop.

Ergebnisse

Probe	Relative Intensitäten
0 μ U-Standard	4,6
2 μ U-Standard	4,5
Serum	4,8

Es zeigt sich, daß Serumbestandteile die Messung nicht stören.

Patentansprüche

1. Bindematrix enthaltend ein flächenförmiges Trägermaterial, das parallel in horizontaler Richtung zu seiner Oberfläche mit einer Vielzahl von räumlich getrennten Bereichen bedeckt ist, die Bindepartner immobilisiert enthalten, die jeweils fähig sind, einen entsprechenden freien Bindungspartner eines spezifischen Bindungspaares zu binden, dadurch gekennzeichnet, daß die Bereiche gebildet werden aus
 - a) sich nicht berührenden Metallschichtspots,
 - b) über Ankergruppen jeweils an die Metallschichtspots gebundene verdünnte und im wesentlichen lateral homogene Bindschichten eines Bindepartners B1.
2. Bindematrix gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Belegung 0,1 bis 90% der maximalen Belegung beträgt.
3. Bindematrix gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Belegung 0,5 bis 70% der maximalen Belegung beträgt.
4. Bindematrix gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Belegung 1 bis 40% der maximalen Belegung beträgt.
5. Bindematrix nach einem der Ansprüche 1—4, dadurch gekennzeichnet, daß die Metallschichtspots aus Gold, Silber oder Palladium bestehen und die Ankergruppen Thiol-, Disulfid- oder Phosphingruppen darstellen.
6. Bindematrix nach einem der Ansprüche 1—5, dadurch gekennzeichnet, daß die Ankergruppe mit dem Bindepartner B1 über ein flexibles Spacermolekül verknüpft ist.

7. Bindematrix nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das flexible Spacermolekül mindestens eine Alkylengruppe der Formel $(CH_2)_n$ enthält, worin n eine natürliche Zahl zwischen 1 und 30 ist.
8. Bindematrix nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß ein Spacermolekül mit zwei oder mehreren Molekülen des Bindeparters verknüpft ist.
9. Bindematrix gemäß Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß sich zwischen dem Spacermolekül und dem Bindeparter eine hydrophile Linkerguppe befindet.
10. Bindematrix nach einem der Ansprüche 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindeschichten der einzelnen Bereiche neben dem mit Bindepatern verknüpften Spacermolekül noch Spacermoleküle enthalten, die mit Ankergruppen versehen sind, aber nicht mit Bindepatern verknüpft sind.
11. Bindematrix gemäß Anspruch 1—10, dadurch gekennzeichnet, daß die Metallspots einen Durchmesser von 0,1—1 mm besitzen.
12. Bindematrix gemäß Anspruch 1—11, dadurch gekennzeichnet, daß pro cm^2 der Bindematrix zwischen 10 und 100 Metallspots aufgebracht sind.
13. Bindematrix gemäß einem der Ansprüche 1—12, dadurch gekennzeichnet, daß auf einzelnen Spots unterschiedlich verdünnte Bindeschichten aufgebracht sind.
14. Bindematrix gemäß Anspruch 1—13, dadurch gekennzeichnet, daß auf einzelnen oder allen Metallspots Bindeschichten mit unterschiedlichen Bindepatern aufgebracht sind.
15. Bindematrix gemäß Anspruch 1—12, dadurch gekennzeichnet, daß auf den Metallspots Bindeschichten mit den gleichen Bindepatern aufgebracht sind.
16. Bindematrix nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Bindeparter B1 Biotin oder ein Biotinanalogon ist.
17. Bindematrix nach einem der Ansprüche 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Bindeparter B1 ein oder mehrere verschiedene mit Antikörpern bindefähige Antigene oder Haptene darstellt.
18. Bindematrix nach einem der Ansprüche 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Bindeparter B1 ein oder mehrere verschiedene Polynukleotide darstellt.
19. Bindematrix gemäß Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß an die Bindeschichten des Bindeparters B1 jeweils eine weitere Bindeschicht eines in allen Bereichen gleichen Bindeparters B2 gebunden ist, der fähig ist, freie Bindungspartner eines spezifischen Bindungspaares zu binden und über eine spezifische Bindestelle an B1 gebunden ist.
20. Bindematrix nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Bindeparter B1 Biotin und der weitere Bindeparter B2 Streptavidin ist.
21. Analyseelement zur Bestimmung unterschiedlicher freier Reaktanden in einer Probe oder zur Bestimmung eines Reaktanden in verschiedenen Proben, enthaltend ein flächenförmiges Trägermaterial, das parallel zu seiner Oberfläche mit einer Vielzahl von horizontal räumlich getrennten Bereichen bedeckt ist, auf denen unterschiedliche oder gleiche spezifische Bindungspartner für freie Reaktanden immobilisiert sind, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Bindematrix gemäß einem der Ansprüche 15, 16, 19 oder 20, an die c) eine an die Bindeparter B1 oder, bei Vorhandensein eines zusätzlichen Bindeparters B2, eine an B2 spezifisch gebundene weitere Bindeschicht enthält, die an ihrer Oberfläche Bindungspartner B3 für zur bestimmende freie Reaktanden enthält.
22. Analyseelement gemäß Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Bindeparter B1 Biotin ist, der eine verdünnte Schicht auf den Metallspots bildet, der Bindeparter B2 Streptavidin ist und die Bindungspartner B3 biotinylierte Reaktandenbindungspartner sind.
23. Verfahren zur Herstellung einer Bindematrix gemäß den Ansprüchen 1—18, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) Metallschichtspots auf die Trägermaterialoberfläche in der Weise aufgebracht werden, daß sie sich nicht berühren
 - b) die freie Oberfläche der Metallschichtspots jeweils mit einer Reaktionslösung inkubiert wird, die Moleküle zur Erzeugung einer verdünnten Bindeschicht enthält.
24. Verfahren zur Herstellung einer Bindematrix gemäß Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, daß die verdünnten Bindeschichten einer Bindematrix gemäß Anspruch 15 oder 16 jeweils mit einer Reaktionslösung inkubiert werden, die einen weiteren Bindeparter B2 für einen freien Bindungspartner mit einer spezifischen Bindestelle für den Bindeparter B1 enthält.
25. Verfahren zur Herstellung eines Analyseelementes gemäß Anspruch 21—22, dadurch gekennzeichnet, daß die freien Oberflächen der Bindeschichten einer Bindematrix gemäß einem der Ansprüche 15, 16, 19 oder 20 jeweils mit gleichen oder unterschiedlichen Lösungen inkubiert werden, die Bindeparter B3 für freie Reaktanden enthalten, wobei die Bindeparter B3 eine spezifische Bindestelle für die Bindeparter B1 oder B2 haben.
26. Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung verschiedener freier Reaktanden in einer Probenlösung oder eines freien Reaktanden in verschiedenen Probenlösungen mittels spezifischer Bindungsreaktionen der Reaktanden mit festphasengebundenen Reaktandenbindungspartnern auf einem flächenförmigen Analyseelement, durch Kontaktieren und Bindung der Reaktanden an diskrete, räumlich voneinander getrennte Binde-Bereiche des Analyseelements und Bestimmung der festphasengebundenen Reaktanden in den verschiedenen Bereichen getrennt voneinander, dadurch gekennzeichnet, daß ein Analyseelement gemäß Anspruch 21 oder 22 verwendet wird.
27. Verfahren gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie erfolgt.
28. Verfahren gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung mittels Oberflächenplasmonresonanz erfolgt.

29. Verwendung einer Bindematrix gemäß einem der Ansprüche 1–20 oder eines Analyseelementes gemäß einem der Ansprüche 21–22 zum multiplen Analytnachweis.
30. Verwendung einer Bindematrix gemäß einem der Ansprüche 1–20 oder eines Analyseelementes gemäß einem der Ansprüche 21–22 für Immunoassays.
31. Verwendung einer Bindematrix gemäß einem der Ansprüche 1–20 oder eines Analyseelementes gemäß einem der Ansprüche 21–22 zur DNA-Diagnostik. 5

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

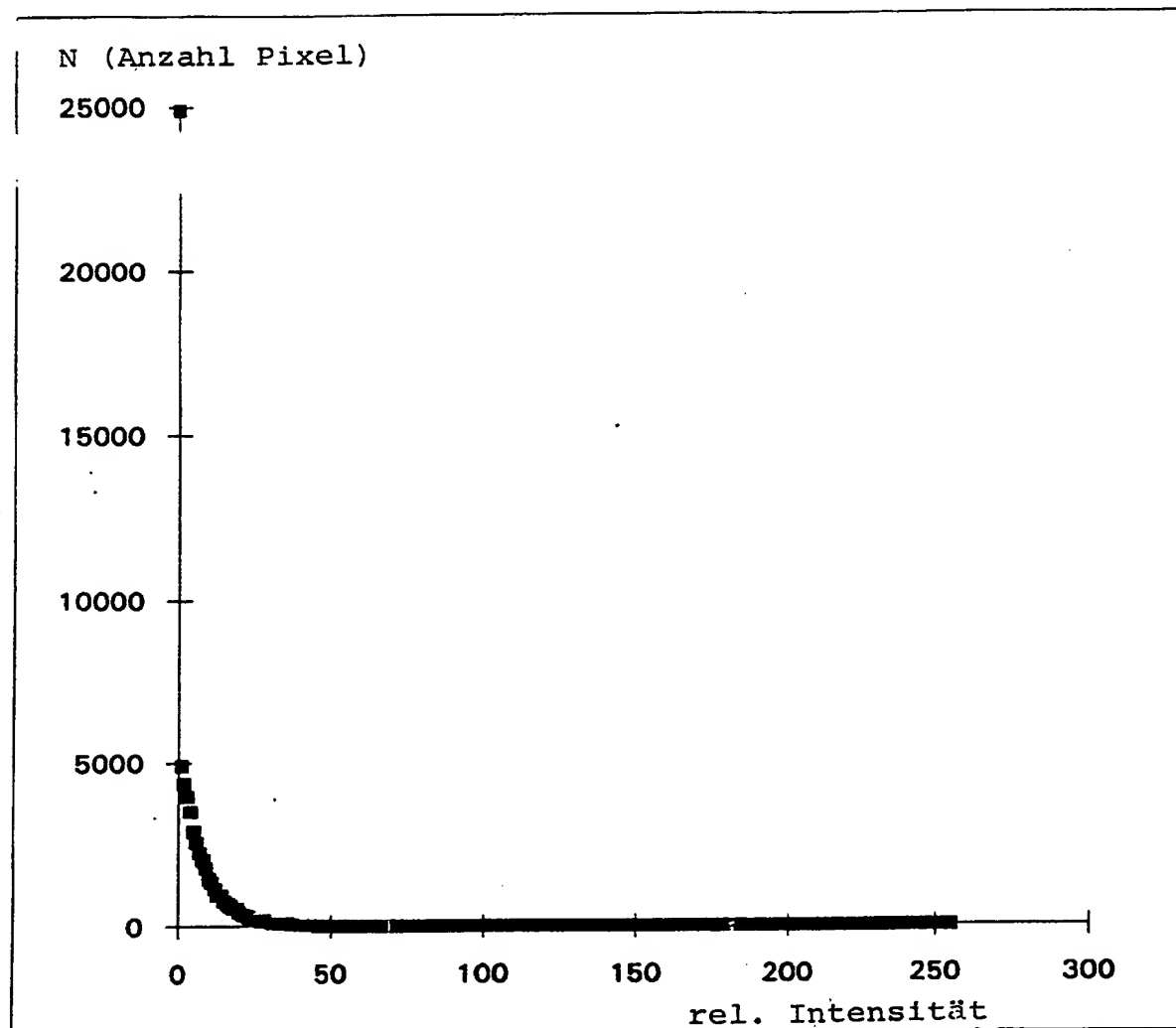
55

60

65

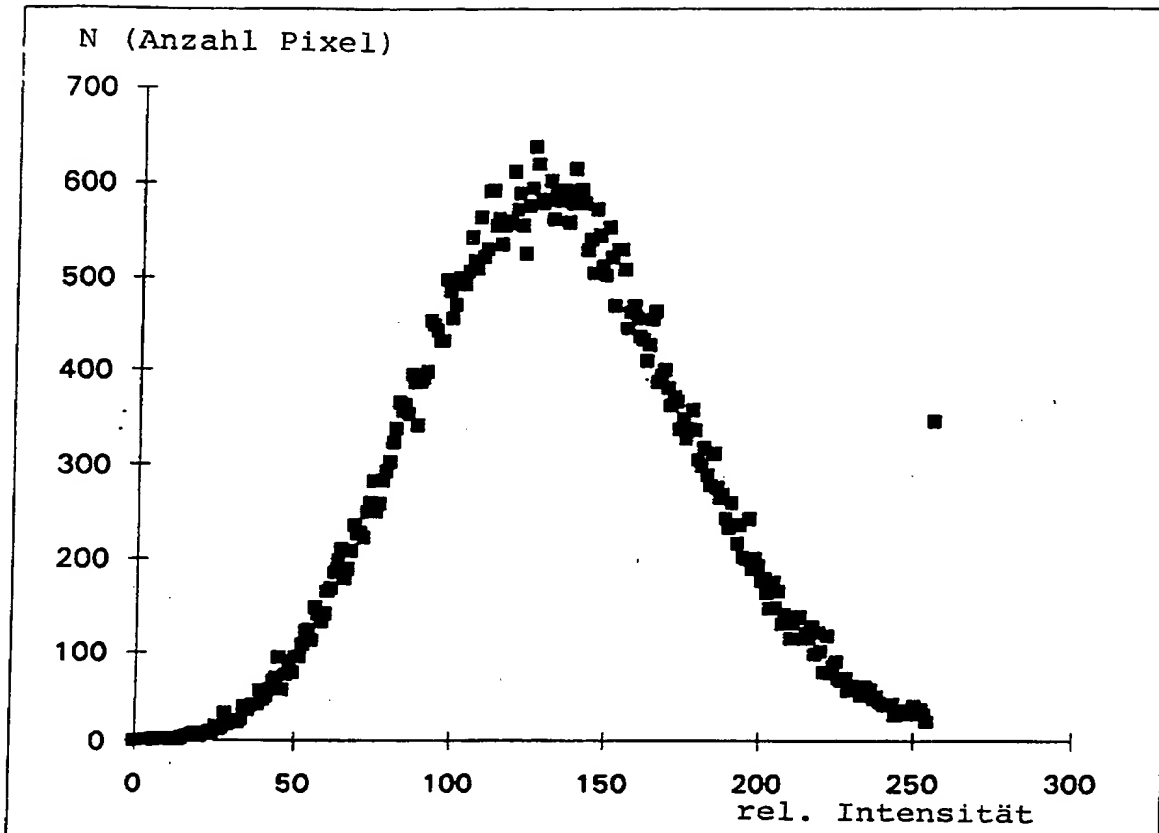
- Leerseite -

Figur 1



EtOH 2 μ U TSH/ml

Figur 2



EtOH 2 μ U TSH/ml